

На правах рукописи



КУЗНЕЦОВ АЛЕКСАНДР ИВАНОВИЧ

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ И ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ
ИММУНОГЛОБУЛИНА G КУНЬИХ**

Специальность

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Казань – 2009

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии
ГОУВПО Удмуртский государственный университет

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Барсуков Алексей Константинович

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор **Дзантиев Борис Борисович**,
кандидат биологических наук,
Уразов Наиль Гумерович

Ведущая организация: Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт гриппа СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург.

Защита состоится «29» октября 2009 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ГОУВПО Казанский государственный университет по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская 18, аудитория 211.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета

Автореферат разослан «29» сентября 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук, профессор



З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Успехи физико-математической и физико-химической биологии обеспечили принципиально новое качественное состояние теоретической медицины и вошли как прикладное знание в современные биомедицинские технологии. С этих позиций значимый интерес представляет международный исследовательский проект «Протеом плазмы крови». Наличие в составе плазмы от 3020 до 9504 индивидуальных белков позволяет рассматривать этот сложный коллоидный раствор как обобщенную многофакторную субстанцию, в которой только один белок-IgG имеет четко выраженную направленность в отношении чужеродной генетической информации (States et al., 2006; Omenn, 2006). На основании фундаментальных представлений о роли антител в элиминации бактерий в составе IgG полагают целесообразным присутствие IgM (Garbett et al., 1989; Werdan et al., 1996). Структурно-функциональные особенности IgA и его целесообразное присутствие в составе иммуноглобулиновых биопрепаратов также учитывается прикладной наукой при проектировании научно-технических нововведений в технологии фракционирования плазмы (сыворотки) крови (Wadsworth et al., 1976). Вместе с тем медицинской генетикой выявлены индивидуальные особенности, согласно которым в человеческой популяции всегда присутствуют отдельные индивидумы, неспособные к биосинтезу IgA. В клинической практике такое генетическое своеобразие выявляется по биосинтезу антител, специфичных к IgA после парентерального введения иммуноглобулина, в составе которого присутствует IgA (Eijkhout et al., 2003). Известно, что олигомеры индивидуальных белков, в частности IgG, способны к активации системы комплемента (Boughton et al., 1990; Nachbaur et al., 1997). Целый ряд работ опубликован о фракционировании плазмы с целью обеспечения инфекционной безопасности конечного продукта (Klein et al., 2005; Horowitz et al., 2004; Burnouf et al., 2000; Панов, 2004). Однако процессы инактивации инфекционных агентов как правило влияют на конформацию белка, что в конечном итоге выражается в олигомеризации и фрагментации молекулы IgG (Le Moli et al., 1989; Hetherington et al., 1984). С точки зрения экономических подходов актуальным вопросом является изучение возможности использования межвидовых субстанций IgG в клинической практике с минимизированным нежелательным (антиген-индуцирующим) эффектом (Mathews, 2008; Martin et al., 2008; Burnouf et al., 2004). К настоящему времени стало возможным компьютерно-аналитическое сопоставление аминокислотных и нуклеотидных последовательностей IgG млекопитающих, в т.ч. выявление межвидовых особенностей их строения (Naumoff, 2005; Finn et al., 2006; Abhiman et al., 2006). Однако для практической биохимии методы информатики имеют определенные ограничения. Во-первых, невозможно однозначно предсказать ориентацию экспонированных участков пептидных цепей IgG, поскольку проблематика фолдинга до настоящего времени не полностью раскрыта (Dill et al., 2007; Moore, 2007). Во-вторых, при сопоставлении нуклеотидных последовательностей геномов не учитываются посттранскрипционные

модификации и последствия, обусловленные белок-денатурирующим эффектом, присущим схемам выделения и очистки IgG. Следовательно, актуален прямой иммунохимический подход, позволяющий по совокупности эпитопов проводить сравнительный анализ видовых IgG. Очевидно также, что схема выделения образцов IgG должна обеспечивать препаративную наработку индивидуальных белков без использования агентов и приемов, обладающих денатурирующим эффектом.

Цель исследования - заключалась в создании исследовательской схемы для определения антигенных характеристик IgG близкородственных видов в рамках научно-технического задела, касающегося фракционирования плазмы (сыворотки) крови для получения иммуноглобулиновой субстанции с надлежащим уровнем инфекционной и биологической безопасности

Задачи исследования:

- Разработать исследовательскую технологию получения стандартизованных форм образцов IgG человека и животных;
- Создать лабораторный набор на основе иммуноферментного анализа для определения IgG норки;
- Оценить различные иммунологические подходы, направленные на описание антигенных характеристик IgG некоторых зоологических видов, формирующих семейство куньих;
- Апробировать способы заготовки и получение IgG-обогащенных фракций для отработки условий проведения стадий, обладающих инактивирующим и элиминирующим действием на инфекционные агенты.

Научная новизна.

Разработаны оригинальные схемы выделения видовых IgG и условия их хранения с минимальным уровнем (до 3%) образования олигомерных форм индивидуальных белков.

Создана исследовательская схема для оценки антигенных свойств IgG близкородственных видов.

Определены приемы крупномасштабного фракционирования гемолизной плазмы (сыворотки), полученной из трупной крови норки при которых сохраняется нативная конформация IgG.

Подобраны условия и определены концентрации риванола и каприловой кислоты позволяющие проводить наработку биопрепаратов IgG из полуфабриката обогащенного IgG.

Отсутствие передачи вирусного начала в составе иммуноглобулинового биопрепарата (Иммуно Н) подтверждено клинико-лабораторными исследованиями экспериментальных серий, изготовленных из инфекционно-опасного сырья.

Практическая значимость.

Результаты исследований легли в основу разработки, согласования и утверждения в соответствии с порядком, действующим в России, нормативно-технической и технологической документации на изготовление экспериментальных серий препарата «Иммуно Н»:

- технические условия (ТУ 9382-003-43683877-03) на препарат “Иммуно Н”, 27 стр.;
- экспериментально-производственный регламент на технологию производства фармацевтического биопрепарата “Иммуно Н”, №001515-ОП, 300 стр.;
- наставление по применению препарата “Иммуно Н” для норок № 13-4-03/0692; № 001515-ОП от 06.03.03 г., 2 стр.

На пилотный проект по производству экспериментальных серий препарата «Иммуно Н» был получен федеральный аттестат № 886 от 02.04.03 г. Из экспертного заключения ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ») следует, что по показателям качества экспериментальные серии препарата «Иммуно Н» аналогов в России не имеют. Результаты проведенных исследований по разработке схем получения стандартизованных форм видовых иммуноглобулинов заложены в проект «Инструкции по изготовлению и контролю видовых IgG человека и животных». В настоящее время материалы и натуральные образцы проходят согласование и испытания в ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ»).

На предложенный способ хранения и получения IgG-обогащенной фракции для изготовления биопрепаратов крови выдан патент на изобретение №2338375 «Способ хранения плазмы или сыворотки крови для получения иммуноглобулиновых и альбуминовых биопрепаратов».

Положения, выносимые на защиту:

1. Исследовательская технология получения стандартизованных форм IgG животных и человека.
2. Разработка лабораторного набора на базе иммуноферментного анализа для определения IgG норки в сыворотке крови, полуфабрикатах и бросовых осадках.
3. Иммунологические принципы выявления гомологии видовых IgG в рамках проблематики использования в клинике гетерологичных иммуноглобулинов.
4. Оценка приемов фракционирования плазмы (сыворотки) крови для проектирования технологии изготовления IgG.

Апробация работы. Результаты исследований представлены на Региональной конференции биохимиков Урала, Поволжья и Западной Сибири, 20-21 сентября 2001 г., г. Ижевск; на Международной конференции «Биотехнология на рубеже тысячелетия», 12-15 сентября 2001 года., г. Саранск; на 5-ой Российской университетско-академической научно-практической конференции, г. Ижевск, 2001 г.; на 6-ой Российской университетско-академической научно-практической конференции, г. Ижевск, 2003 г.; на II Евразийском конгрессе по медицинской физике и инженерии “Медицинская физика - 2005”, Москва, 2005; на I съезде физиологов СНГ, Сочи, 2005; на Международной конференции инженерного образования, 25-29 июля 2005 г., г. Гливиц (Польша); на II Всероссийском форуме «Здоровье нации – основа

процветания России», Москва, 2006; на Второй международной научно-практической конференции «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности», Санкт-Петербург, 2006; на XIX Международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии», Уфа, 2006; на Третьей международной научно-практической конференции «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности», Санкт-Петербург, 2007; на Четвертой международной научно-практической конференции «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности», Санкт-Петербург, 2007; на VI конференции иммунологов Урала, Ижевск, 2007.

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 10 работ. В соответствии с порядком, действующим в РФ, разработан, согласован и утвержден комплект нормативно-технической и технологической документации на изготовление и изучение ветеринарного иммуноглобулинового препарата нового поколения «Иммуно Н»: Технические условия ТУ (ТУ 9382-003-43683877-03, 27 стр.), Экспериментально-производственный регламент производства на препарат «Иммуно Н» (№001515-ОП, 300 стр.) и наставление по применению препарата «Иммуно Н» (№ 13-4-03/0692; № 001515-ОП, 2 стр.).

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 125 страницах, содержит 10 рисунков и 19 таблиц. Список используемой литературы включает 185 источников, в том числе 154 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В проведенном исследовании использовали нижеследующие материалы, реагенты и комплектующие.

Получение плазмы (сыворотки) крови

Заготовку сырья для получения плазмы (сыворотки) крови пушных животных проводили в зверохозяйствах «Можгинское» (Республика Удмуртия), «Бирюли» и «Кошачовское» (Республика Татарстан). Кровь норки (*Mustela vison*), хорька (*Mustela putorius*), соболя (*Martes zibellina*), песца (*Alopex lagopus*), лисы (*Vulpes vulpes*.) собиралась во время проведения плановых забоев животных. Сбор крови осуществляли с использованием антикоагулянта (9% Na_3PO_4) в соотношении кровь/антикоагулянт 2:1. Далее кровь разделяли на форменные элементы крови и плазму с помощью сепаратора (Ж5-АС-2Ж). Плазма (сыворотка) крови человека предоставлена Республиканской станцией переливания крови г. Ижевска (Республика Удмуртия). Полученные плазма и сыворотка крови подвергались в дальнейшем обработке фенолом (1%) и сульфатом аммония (50% от насыщения) (патент на изобретение №2338375). Сыворотка домашних животных (лошади, коровы, барана, свиньи, собаки) предоставлена Можгинской районной ветеринарной

лабораторией, полученная из сельскохозяйственных предприятий Можгинского района (Республика Удмуртия), сыворотка крысы из вивария Удмуртского госуниверситета. Полученные кровь и сыворотка использовались для выделения образцов IgG.

Оборудование и реактивы

Приборная база исследований представлена вертикальным абсорбциометром Multiskan Ascent (Termo Fisher Scientific, Финляндия), жидкостным хроматографическим комплексом низкого давления (Pharmacia, Швеция), укомплектованным коллектором фракций, проточным детектором, регистратором, градиентным формером и комплектом колонок, установкой для электрофореза и иммуноэлектрофореза Hoefer (Amersham Biosciences, Великобритания), денситометром гелей ImageScanner (Amersham Biosciences, Великобритания).

Хроматографические стадии выполняли с помощью сорбентов: аффинных - протеин А-сефароза CL 6B (Pharmacia, Швеция); гидрофобных - бутил-тоиоперл (Toyo Soda, Япония), фенил-сефароза (Pharmacia, Швеция); ионообменных - DE-52 (Whatman, Великобритания); гель-хроматографию на сефадексе G-200 (Pharmacia, Швеция). Стадии концентрирования белка и удаления низкомолекулярных примесей проводились с помощью ультрафильтрационной установки на полых волокнах УВА-ПА-0,1 с номинально отсекаемой молекулярной массой 10 кД. Для проведения ИФА использовали планшеты «Nunc» (Дания).

Аналитические процедуры осуществляли с использованием реактивов SIGMA" (США), Serva" (Германия), "Reanal" (Венгрия): Меркаптоэтанол-2, Акриламид 4-кристаллизованный, Персульфат аммония, Глицин, Бис-акриламид, ТЕМЭД, Додecilсульфат-Na, Три(оксиметил)аминометан, Агароза со средним показателем электроэндоосмоса. При синтезе иммунопероксидазного конъюгата, специфичного к IgG норки, использовали пероксидазу хрена с RZ~3,0 «SIGMA» (США), периодат натрия и боргидрид натрия. Для нехроматографического фракционирования коллоидных растворов белка использовали реагенты, предназначенные и разрешенные к использованию Национальным контролирующим органом (НКО) РФ в производстве фармацевтических биопрепаратов: ПЭГ 4000 (ФС 42-3337-96), риванол (этакридин лактат, ФС 42-2799-91), каприловая кислота (ТУ 6-09-529-75), этанол (ФС 42-3072-00).

Методы исследования

Хроматографическое фракционирование при получении IgG человека и норки выполняли в колоночном варианте с учетом рекомендаций и методологических подходов, изложенных в монографиях и оригинальных исследованиях (Protein Purification. Handbook. 2001; The Protein Protocols. Handbook. 2002; Остерман, 1985).

Электрофоретический анализ проводили в соответствии с базовыми методами Лэммли и Дэвиса в градиентном 5-25% ПААГ в нативных и восстанавливающих условиях (Garfin, 1990).

Иммуноэлектрофорез проводили согласно рекомендациям, изложенным в монографии изложенным в монографии под редакцией Фримеля (1987).

Ферментативную активность протеаз в фенольно-сульфатной суспензии оценивали методом на основе определения трипсиноподобной активности в надосадочном растворе по методу Эрлангера (Erlanger *et al.*, 1961) в модификации В.А. Шатерникова (Шатерников, 1966).

Концентрацию общего белка определяли биуретовым методом (Досон и др., 1991).

Определение остаточных концентраций сульфата аммония оценивали по титру SO_4^{2-} в качественной реакции с ионами бария по образованию осадка или появлению опалесценции (в зависимости от концентрации сульфат-ионов).

Метод дробного осаждения белков использовали при нехроматографическом фракционировании плазмы (сыворотки) крови с применением сульфата аммония, ПЭГ 4000, риванола, каприловой кислоты, этанола. Осадок и надосадок получали центрифугированием суспензии при 5000 об/мин в течение 30 мин., на центрифуге ОПН-8 или РС-6.

Препаративную схему фракционирования плазмы (сыворотки) отработывали в заводских условиях при объемах сырьевой закладки в пределах 190-206 литров плазмы (сыворотки) крови.

Получение антисывороток осуществляли стандартным образом (Dresser, 1986) с небольшими модификациями.

Мониторинг за процессом иммунизации осуществляли методом двойной иммунодиффузии (ДИД) по Ouchterlony O. (1962).

Синтез иммунопероксидазных конъюгатов для проведения ИФА осуществляли согласно M.B Wilson, R.K Nakane (1978). Иммуноферментный анализ оптимизировали для непрямого и прямого конкурентного методов (Егоров, Дзантиев, 1991).

Определение иммуноглобулинов класса IgM, IgA в различных фракциях. определяли методом радиальной иммунодиффузии по G. Mancini (1965) с использованием наборов стандартных моноспецифических сывороток против иммуноглобулинов человека (IgA, IgM) производства «ИмБио» в соответствии с методическими рекомендациями [Фримель, 1987].

Оценку микробного роста в фенольно-сульфатной суспензии в процессе хранения проводили при помощи посева образцов на мясо-пептонный агар в чашках Петри. Подсчёт колонии микроорганизмов проводили через 2-5 суток инкубации. Результаты параллельных высевов из одной пробы суммировали и определяли среднее число колоний, выросших при высеве на одной чашке.

Процент чистоты IgG для иммунизации, оценивали электрофорезом в градиентном 5-25% ПААГ в нативных и восстанавливающих условиях с последующим денситометрированием гелей на приборе ImageScanner «Amersham Biosciences» (Великобритания) в красном свете. Минимальное количество белка в треке, при котором максимальная оптическая плотность в пятне достоверно отличалась от фонового сигнала – 0.5 мкг. В иммуноэлектрофорезе чистота оценивалась по отсутствию преципитационных полос отличных от IgG.

Процент чистоты IgG при оптимизации стадий очистки нехроматографическими и хроматографическими способами рассчитывали как отношение количества IgG во фракции (определенного с помощью сконструированного в лаборатории набора на основе прямого конкурентного ИФА) к количеству общего белка во фракции.

Фактор очистки рассчитывали как отношение процента чистоты IgG во фракции к проценту чистоты IgG в исходном сырье.

Процент выхода рассчитывали как отношение количества IgG во фракции к количеству IgG в исходном сырье.

Процент иммунологической гомологии (сходства) рассчитывался в двойной иммунодиффузии (ДИД) как обратный титр специфических IgG, получаемый в гомологичной системе, который принимали равным 100 %, а связывание всех гетерологичных иммуноглобулинов оценивали как долю от соответствующего связывания гомологичного IgG.

$\% \text{ сходства в ДИД} = Г/Н \times 100\%$, где

Г – величина обратная титру видовых IgG; Н – величина обратная титру IgG норки.

Расчет уровня иммунологического сходства в прямом ИФА основан на определении соотношения оптических плотностей (ОП) при максимальных (10 мкг/мл) концентрациях иммобилизованных IgG различных животных и человека.

Уровень иммунологического сходства рассчитывали в %, по формуле:

$$\% \text{ в прямом ИФА} = \frac{ОП_K - K}{ОП_H - K} \times 100\%, \text{ где}$$

К – величина оптической плотности фона в пробе при концентрации сывороточного альбумина норки 10 мкг/мл; ОП_К – оптическая плотность образцов видовых IgG при их постоянной концентрации 10 мкг/мл; ОП_Н – оптическая плотность при концентрации IgG норки 10 мкг/мл

Расчет уровня иммунологического сходства в прямом конкурентном ИФА основан на определении соотношения оптических плотностей при значениях оптической плотности, обеспечивающей 50% уровень ингибирования (связывания ИПК анти-IgG норки).

Уровень иммунологического сходства рассчитывали в %, по формуле:

$$\% \text{ в конкурентном ИФА} := \frac{K - ОП \text{ конкурента}}{K - ОП_{50} \text{ норки}} \times 100\%, \text{ где}$$

К – величина оптической плотности в отсутствие конкурентов, ОП₅₀ – оптическая плотность при концентрации IgG норки, обеспечивающая 50% уровень связывания ИПК анти-IgG норки, ОП конкурента – оптическая плотность образцов видовых IgG при их постоянной концентрации

Статистическая обработка результатов. При анализе и обобщении результатов исследований использовали методы статистической обработки,

общепринятые в биологии. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$. Полученные результаты подвергали статистической обработке средствами программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение стандартизованных форм видовых IgG

Задачей проведенных экспериментов, представленных в данном разделе было создание универсальной схемы выделения IgG с необходимым уровнем электрофоретической гомогенности и мономерных по составу фракций белка.

С целью получения очищенных и конформационно нативных образцов видовых IgG использовали реагенты и методы фракционирования с минимальным белок-денатурирующим эффектом. Осаждение IgG из пула плазмы (сыворотки) крови осуществляли с помощью ПЭГ при концентрации 15% и значениях pH среды равной $8,0 \pm 0,1$.

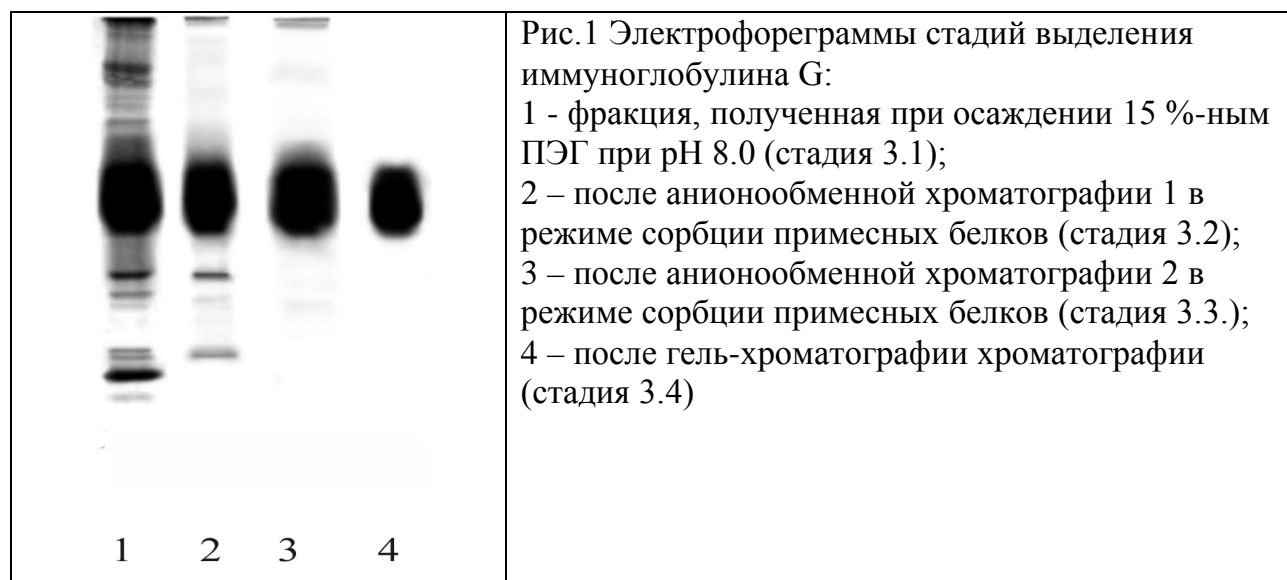
Далее обогащенные IgG осадки растворяли в соответствующих буферных растворах с необходимыми значениями pH и ионной силы для проведения стадий хроматографической очистки. Для дальнейшей очистки были использованы различные виды сорбентов. На основе протеин А-сефарозы выделяли фракцию IgG. Полученные продукты имели высокую степень чистоты (92-97%), но процент выхода целевого белка варьировал в достаточно широком интервале (75-95%). От дальнейшего применения аффинного сорбента на первых стадиях очистки для использования в универсальной схеме получения высокоочищенной формы видовых IgG, было решено отказаться ввиду малой сорбционной емкости сорбента, достаточно жестких условий десорбции (низкое значение pH) и отсутствие сорбции определенных подклассов IgG некоторых видов животных на протеин-А. Относительно высокий процент выхода IgG (78-94% и 80-92% для фенол-сефарозы и бутил-тойоперл, соответственно) и низкая селективность хроматографии (56-75% чистоты) позволяют заключить, что данная стадия не имеет дальнейших перспектив в рамках цели проводимых исследований. Сравнительный анализ данных показал, что анионообменное фракционирование позволяет получать IgG с наиболее высоким выходом (75-83%) и степенью чистоты в пределах 85-96%. При этом в составе IgG фракций в иммуноэлектрофорезе регистрируется трансферрин, IgA и IgM. Для повышения уровня чистоты целевого белка в дальнейших исследованиях изучалась возможность анионообменной сорбции IgA на основе различий в изоэлектрических точках IgG и примесных белков. За счет варьирования pH и ионной силы уравнивающего буферного раствора определяли условия, при которых из состава фракции, представленной на 85-96% IgG происходит сорбция IgA. Далее изучали количественное соотношение белок-сорбент с целью минимизации сорбции IgG при установленном значении pH и ионной силы уравнивающего буферного раствора. Указанный эффект достигался при использовании 0.05 М трис-HCl уравнивающего раствора, pH 8.5, в соотношении 200 мг стандартизированной (85-96% чистоты) IgG фракции/мл сорбента. Таким образом, первая стадия анионообменной

хроматографии (табл. 1, 3.2) имеет своей задачей получение фракции IgG при уровне очистки 85-96%. Вторая (ключевая) стадия (табл. 1, 3.3) позволяет удалять из очищенной формы IgG примеси IgA. Полагаем, что снижение выхода видовых IgG на 10-13% не является принципиальным, т.к. данная стадия позволяет удалить IgA, сходный по молекулярной массе целевому белку, а также IgM и трансферрин, включая гем-производные, в т.ч. модифицированные гемом молекулы иммуноглобулина G. Стадия гель-хроматографии (табл. 1, 3.4.) предназначена для выделения мономерных форм IgG без их олигомеров, фрагментов, денатурированных форм белка и остаточных концентраций ПЭГ.

Таблица 1

Характеристика лабораторных схем выделения особо чистых форм IgG норки, хорька, соболя, человека.

Шифр стадии	Стадия	% чистоты	% выхода	Фактор очистки
Анионообменная хроматография				
3.1	Осаждение ПЭГ (15% pH 8.0)	48-55	91-97	3,8-5,5
3.2	Анионообменная хроматография 1 (сорбция примесных белков: pH 6.5, 0.0175 М натрий-фосфатный буфер; соотношение масса белка/объем сорбента не превышало 50 мг/мл)	85-96	75-83	6,8-9,4
3.3	Анионообменная хроматография 2 (сорбция примесных белков: pH 8.5, 0.05 М трис-HCl буфер; соотношение масса белка/объем сорбента составляло 200 мг/мл)	90-96	60-70	7,2-9,6
3.4	Гель-хроматография	96-99	35-54	7,7-9,9



На рисунке 1 (1-4) в качестве примера приведены электрофореграммы последовательных стадий фракционирования сыворотки крови для получения стандартизированной формы IgG.

Образцы очищенных форм видовых IgG представлены на рис. 2

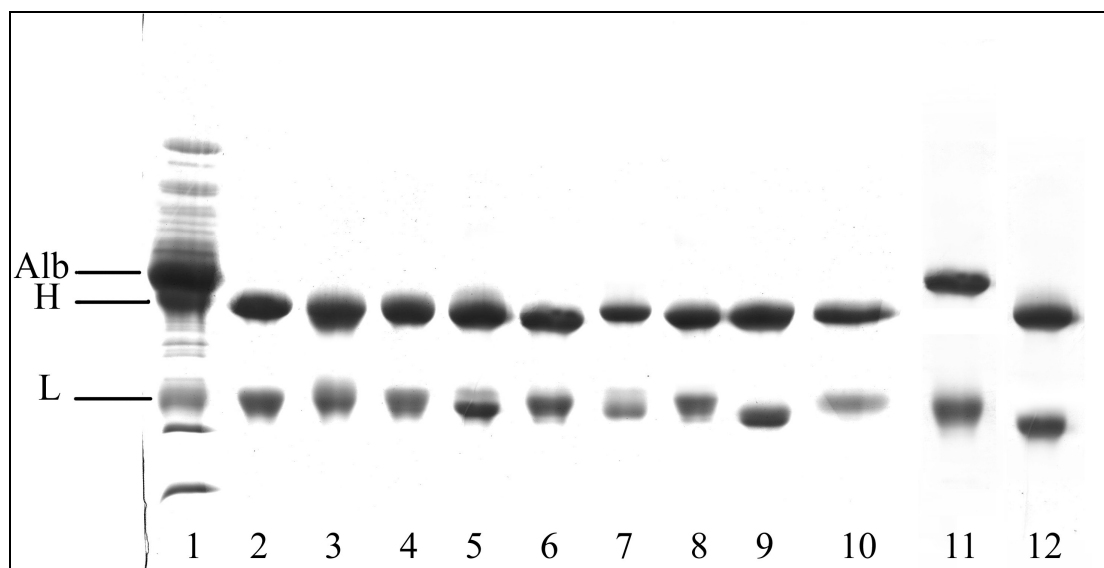


Рисунок 2. Электрофореграмма образцов стандартизированных форм IgG человека и животных.

Электрофорез проводился в градиентном (3-25%) полиакриламидном геле, количество белка на трек 40 мкг (в первом треке 60 мкг). Образцы восстановлены меркаптоэтанолом.

1 – плазма крови человека, 2 - IgG барана, 3 - IgG лошади, 4 – IgG соболя, 5 – IgG человека, 6 – IgG лисы, 7 – IgG норки, 8 – IgG собаки, 9 – IgG свиньи, 10 – IgG песца, 11 – IgG курицы, 12 – IgG хорька. Alb – альбумин, H – тяжелая цепь иммуноглобулина, L – легкая цепь иммуноглобулина

Изучалось влияние длительного хранения очищенных образцов IgG на их свойства. С этой целью образцы IgG хранили при $(8 \pm 2)^\circ\text{C}$ в присутствии сульфата аммония при его конечной концентрации 50% от насыщения. Установлено, что в течение года в составе образцов IgG формировались олигомеры, регистрируемые в ПААГ-электрофорезе и с помощью гель-хроматографии на геле сефадекса G-200. Через 2 года хранения фрагментирование целевых белков нами не обнаружено, а уровень олигомеров возрос до 3%. Не исключено, что процесс олигомеризации мономерных форм индивидуальных белков обеспечивает им новые свойства, в т.ч. на уровне представительства антигенных детерминант в составе сформировавшихся агрегатов. Изменение антигенных свойств образцов IgG определяли в прямом и прямом конкурентном ИФА, используя для конструирования аналитических иммуносорбентов и градуировочных зависимостей образцы хранения и их мономерные формы. В прямом варианте ИФА чувствительность анализа была одинаковой и составляла 9,8 нг/мл в системе взаимодействия с адсорбционно иммобилизованными IgG норки и специфическими ИПК-антиIgG. Аналогичный вывод следует из сравнительных исследований на основе прямого конкурентного ИФА, в котором чувствительность 39,1 нг/мл была

одинаковой независимо от использования мономерных форм IgG или их образцов хранения. Изучение свойств образцов хранения этих белков позволяет обсуждать их применение в качестве стандартов при исследовании производственных серий иммуноглобулиновых и альбуминовых биопрепаратов, а также ИПК антиIgG, в т.ч. из иммуноферментных диагностикумов для выявления антител из класса IgG.

Представленные результаты позволяют сделать заключение, что предложенная универсальная схема выделения видовых IgG позволяет получить высокоочищенную мономерную форму иммуноглобулина G из плазмы (сыворотки) различных животных и человека. В предложенных условиях хранения возможна олигомеризация IgG до 3%, но, тем не менее, она не влияет на его поведение в различных вариантах ИФА.

Разработка лабораторного набора для определения IgG норки

В разработку набора для определения IgG норки на базе иммуноферментного метода входило изготовление необходимых иммунореагентов. Выделение IgG норки для проведения иммунизации проводили на основе разработанной и описанной ранее схемы. Специфичность иммуносыворотки и соответствующего набора обеспечивали качеством иммуногена, схемой иммунизации и контролем в иммуноэлектрофорезе. Индивидуальные образцы иммуносывороток объединяли, если в иммуноэлектрофорезе с IgG норки формировалась единственная дуга преципитации в области подвижности γ -глобулинов при активности антител в пределах $1/16 - 1/32$. В оптимизацию анализа входило определение стандартного разведения синтезированного ИПК. Для этого в течение ночи адсорбировали иммуноген (IgG норки) при постоянной концентрации белка 1 мкг/мл общепринятым способом. Стандартным разведением ИПК анти-IgG норки считали такое его разведение, которое в прямом методе анализа обеспечивало формирование оптической плотности $ОП_{493} = 1,2 \pm 0,1$ с субстратом ОФД. На основе ИПК анти-IgG норки в стандартном разведении конструировали прямой метод иммуноферментного анализа.

Установлено, что чувствительность прямого варианта ИФА составляла 9,8 нг/мл. Изменения оптической плотности и достоверные различия ее значений определяют линейный интервал градуировочной зависимости. Линейная часть градуировочной зависимости находилась в интервале 9,8 - 1250 нг/мл, а рабочая (нелинейная часть) соответствовала концентрациям вплоть до 10 мкг/мл. Для оценки неспецифической сорбции использовали альбумин норки и IgG различных видов животных и человека. Использовались концентрация альбумина норки – 10 мкг/мл, концентрации видовых IgG составили 1,25 и 10,0 мкг/мл. Уровень неспецифической сорбции ИПК анти-IgG норки на адсорбционно иммобилизованный альбумин норки составил $0,078 \pm 0,011$ ед. оптической плотности. Что демонстрирует незначительную сорбцию в пределах допустимых значений. Значения сорбции ИПК на иммобилизованные видовые IgG варьировали в достаточно широких пределах от $0,082 \pm 0,010$ до $0,587 \pm 0,05$ при концентрации IgG 1,25 мкг/мл и от

0,095±0,011 до 0,887±0,062 при концентрации IgG 10,0 мкг/мл. Необходимо подчеркнуть, что прямой метода анализа ИФА непосредственно в аналитической биохимии не используется. В данном случае его применение сводилось к оптимизации конкурентного ИФА и выявлению уровня гомологии видовых IgG среди животных одного и того же семейства в условиях максимально возможного лимитирования ИПК анти-IgG.

На основании предварительных результатов, полученных в прямом методе ИФА, конструировали конкурентный метод анализа при концентрации 1 мкг/мл адсорбционно иммобилизованного IgG норки, а ИПК анти-IgG норки использовали в стандартном разведении ($OP_{493} = 1,2 \pm 0,1$). Градуировочная зависимость гомологичных IgG находилась в пределах 2,4 нг/мл – 5 мкг/мл. Чувствительность набора определена на уровне 39,1 нг/мл. Линейный участок кривой находится в интервале 39,1 – 625 нг/мл. Холостая проба, содержащая 10 мкг/мл альбумина норки, формировала оптическую плотность $1,205 \pm 0,098$.

При использовании твердофазных методов за счет адсорбционной иммобилизации IgG невозможно обеспечить необходимую для количественного определения точность анализа (Войцеховский, 1988). Также невозможно достичь необходимого показателя качества набора в тесте на открытие ввиду диффузионных ограничений и протекания реакции на границе раздела фаз (Вербов, 1988). Результаты определения важнейшего показателя – отсутствие перекрестных реакций с близкородственными белками или белками со сходными структурами с точки зрения наличия подобных антигенных детерминант – определить не представляется возможным. Данные, полученные с помощью ДИД или иммуноэлектрофореза, не могут полностью удовлетворять необходимым требованиям. Поскольку чувствительность данных методов примерно на три порядка ниже по сравнению с методами, основанными на иммуноферментном варианте анализа. На основании вышеизложенного были проведены исследования, представленные в следующем разделе, направленные на изучение иммунологического сходства видовых IgG с использованием методологических принципов анализа и соответствующих подходов представленных в настоящем разделе.

С учетом изложенного использовали следующие исследовательские подходы к проведению экспериментов: 1) при постановке ДИД вместо иммуносыворотки, использовали фракцию IgG кролика, специфичную к IgG норки при постоянной концентрации белка 10 мг/мл; 2) объектом исследования служили видовые образцы IgG в биохимически чистой форме, гомогенные в ПААГ-электрофорезе, без олигомеров и фрагментов целевого белка; 3) постановка ИФА базировалась на оптимизированных вариантах схем, с соответствующими градуировками и контролями, воспроизводимыми в каждой планшете; 4) градуировочные зависимости и результаты анализа фиксировались непосредственно, без использования математических моделей обработки информации (Войцеховский, 1988).

Исследование антигенной структуры видовых IgG в гомологичной системе анализа (IgG норки – анти-IgG норки)

Проведено изучение антигенного строения видовых IgG с помощью иммунореагента на основе поликлональных антител с целью определения усредненных значений иммунологического сродства. Для сравнительных исследований IgG различных видов животных и человека были использованы варианты иммунопреципитационных и иммуноферментных методов анализа. При постановке ДИД использовали небольшие модификации. Вместо цельной антисыворотки использовалась фракция IgG с концентрацией 10 мг/мл, выделенная из пула иммуносывороток, специфичных к IgG норки. Для повышения чувствительности в состав агарозы вводили ПЭГ до концентрации 3 %, а преципитаты окрашивали с помощью амидочерного 4В [Кэтти и др., 1991]. В прямом варианте ИФА в системе анализа IgG норки – ИПК анти-IgG норки исследовали калибровочные пробы, приготовленные на основе видовых IgG. Гомологичные и гетерологичные калибранты использовали также в прямом конкурентном методе.

Таблица 2

Уровень иммунологического сходства иммуноглобулина G норки и IgG различных животных и человека

Животное	ДИД		Прямой ИФА, ОП _П		Конкурентный ИФА, ОП _К	
	титр	%	$\bar{x} \pm \sigma$	%	$\bar{x} \pm \sigma$	%
Норка	1/64	100	1,214\pm0,153	100	0,582\pm0,05**	100
Соболь	1/64	100	0,907 \pm 0,110*	73	0,933 \pm 0,087**	44
Хорек	1/64	100	0,782 \pm 0,080*	62	1,014 \pm 0,073**	32
Лиса	1/16	25	0,327 \pm 0,043*	22	1,173 \pm 0,089	4
Песец	1/16	25	0,248 \pm 0,036*	15	1,192 \pm 0,110	1,3
Собака	1/16	25	0,192 \pm 0,017*	10	1,196 \pm 0,077	0,7
Человек	1/8	12,5	0,112 \pm 0,015*	3	1,178 \pm 0,091	3,5
Баран	1/1 (цельная)	1,6	0,111 \pm 0,014*	3	1,191 \pm 0,085	1,5
Лошадь	1/1 (цельная)	1,6	0,108 \pm 0,013*	3	1,207 \pm 0,086	1,1
Корова	1/1 (цельная)	1,6	0,098 \pm 0,011*	2	1,182 \pm 0,107	2,9
Свинья	1/1 (цельная)	1,6	0,092 \pm 0,010*	1	1,205 \pm 0,084	0,8
Крыса	1/1 (цельная)	1,6	0,091 \pm 0,009*	1	1,203 \pm 0,084	0,5
фон	0		0,078 \pm 0,011 (САН, 10 мкг/мл)		1,205 \pm 0,098 (отсутствие конкурента)	

Примечание: \bar{x} - ср. арифметическая, σ – ср. квадратичное отклонение, n=6;

ОП_П – оптическая плотность образцов при концентрации адсорбционно иммобилизованных IgG 10 мкг/мл; ОП_К – оптическая плотность образцов IgG при их постоянной концентрации (156 нг/мл), которая обеспечивает в гомологичной системе анализа (IgG норки) ~50% ингибирование;

* - достоверные различия по сравнению с гомологом (IgG норки) при уровне значимости $p < 0,05$

** - достоверные различия по сравнению с фоном (отсутствие конкурентов) при уровне значимости $p < 0,05$

На основании результатов, представленных в табл. 2 можно сделать вывод, что анализ на основе иммунопреципитации выявляет сходство практически всех видовых IgG. При этом различия между IgG представителей семейства кунных (норка, соболь, хорек) не выявлено, следовательно, образцы сравнения характеризуются 100% иммунологической идентичностью поскольку титр в гомологичной системе анализа составил 1/64 для всех представителей кунных. Если сравнивать видовые IgG семейства кунных в прямом методе ИФА, то уровень сродства различен для IgG соболя, IgG хорька. Об этом свидетельствуют прежде всего профили градуировочных зависимостей, воспроизведенных для образцов IgG семейства кунных (табл. 2, рис. 3). В табл. 2 представлены численные значения различий в антигенном строении образцов сравнения, которые вычислены по формуле как отношение в % величины ОП₄₉₃ гетерологичного IgG к ОП₄₉₃ гетерологичного IgG при максимально возможной (10 мкг/мл) концентрации антигена. Оставшиеся видовые IgG связывали ИПК анти-IgG норки на уровне значений контроля.

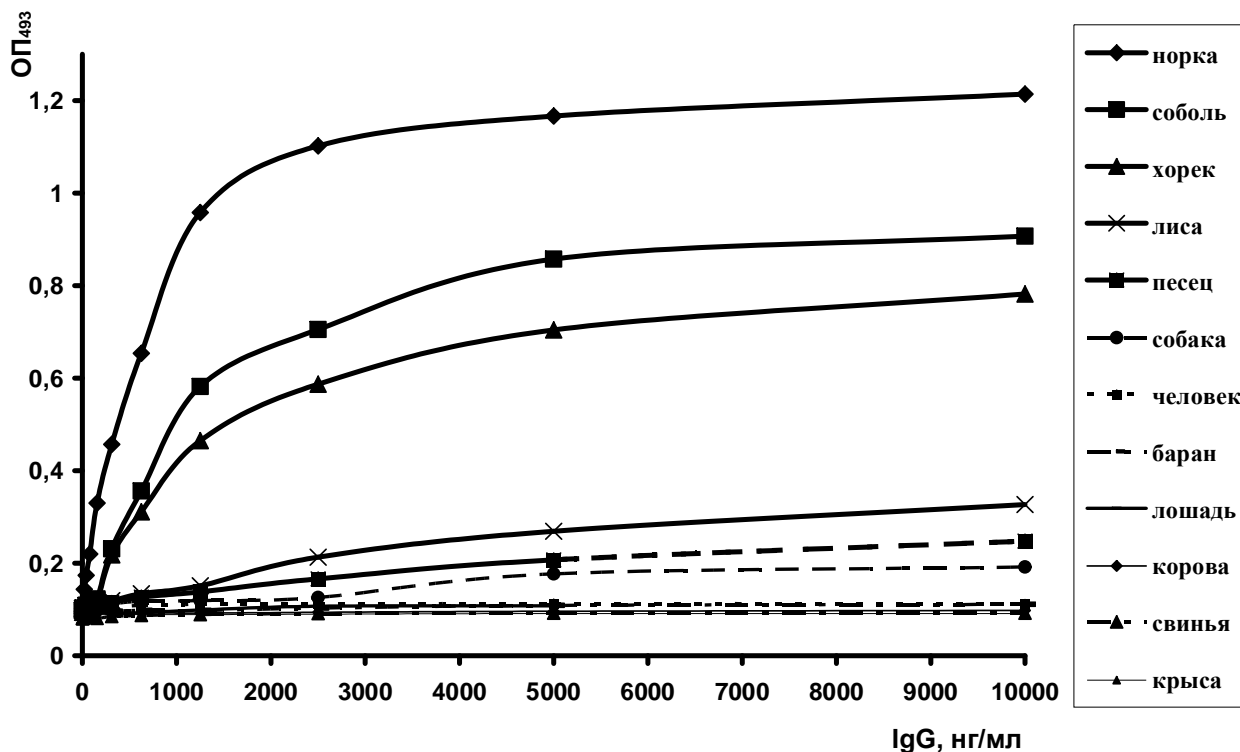


Рис. 3. Градуировочные зависимости гомологичных и гетерологичных IgG в прямом варианте ИФА

В условиях лимитирования концентрации аналитических антител в составе ИПК анти-IgG норки (стандартное разведение связывающего иммунореагента при постоянной концентрации антигена (1 мкг/мл) моделировали конкуренцию за центры связывания избытка антигеннородственных (гетерологических IgG) белков. Если сравнивать видовые IgG в конкурентном анализе в условиях лимитированных

концентраций, то различия между образцами сравнения носят достоверный характер. При сравнении одинаковых концентраций IgG соболя и хорька, соответствующих концентрации IgG норки (156 нг/мл) и 50%-ому ингибированию в градуировочной зависимости, уровни сродства для гетерологичных образцов составили 44 и 32 %, соответственно (табл. 2, рис. 4).

Таким образом, иммунопреципитационный метод и прямой метод ИФА показали наличие гомологии (перекрестных реакций) с различными гетерологичными IgG, в то время как наиболее адекватный метод для оценки гомологии (прямой конкурентный ИФА) выявил наличие перекрестных реакций с IgG норки только у представителей семейства кунных.

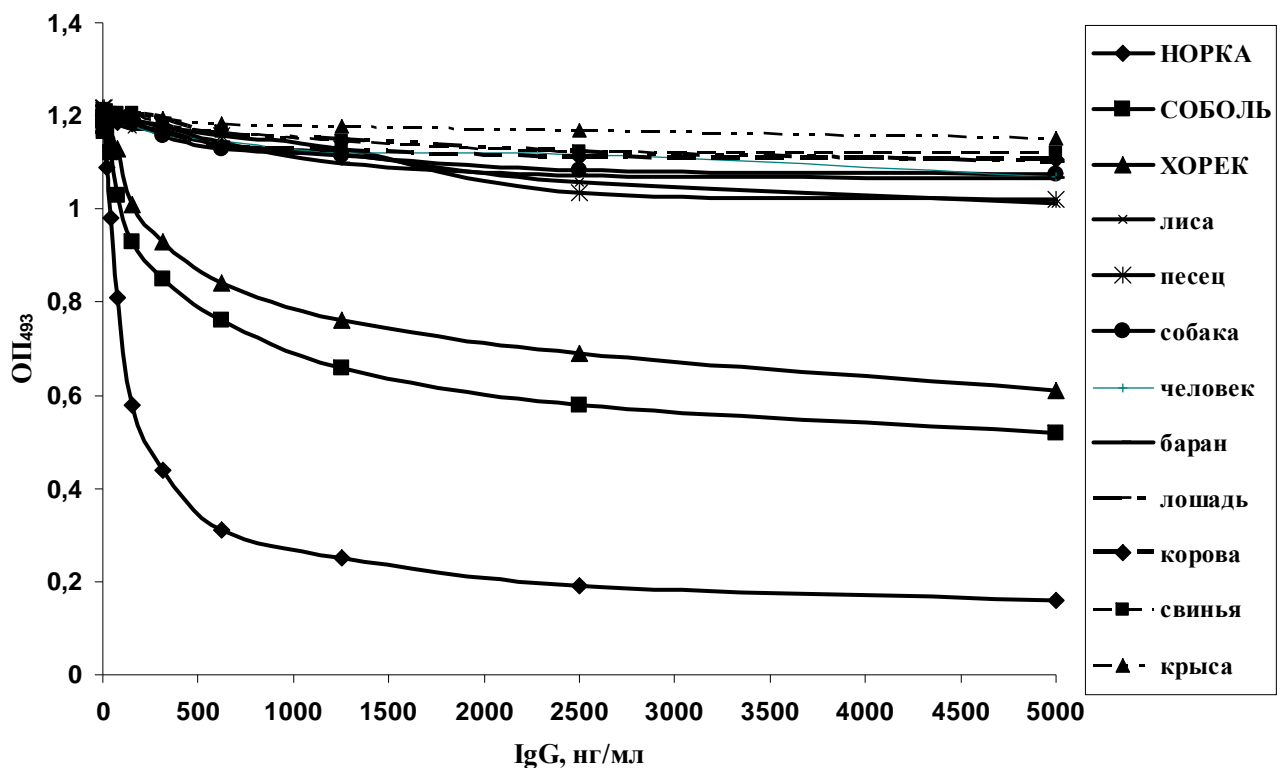


Рис. 4. Градуировочные зависимости гомологичных и гетерологичных IgG в прямом конкурентном варианте ИФА

Способ получения и хранения фракции IgG из плазмы (сыворотки) крови

Для производства биопрепаратов из плазмы крови используются различные способы заготовке сырья и его хранения. В ходе проведенного исследования изучалась возможность создания способа заготовки сырья включающего в себя возможность длительного хранения без использования энергоемких технологий (типа глубокой заморозки), совмещенной с созданием условий способствующих инактивации вирусных частиц. В рамках этой задачи исследовалась возможность хранения заготовленной плазмы (или сыворотки) крови при обработке ее фенолом с последующим фракционированием при помощи сульфата аммония. Фенол обладает бактерицидными и вирусиактивирующими свойствами. Сульфат аммония считается реагентом

способным длительно сохранять биологическую активность молекул белка, следовательно сохранять их нативную структуру.

40%-й раствор фенола в глицерине вносили до его конечной концентрации 0,3%, 0,5%, 1,0% при заготовке плазмы или сыворотки крови и выдерживали в течение 5 суток при температуре $(10 \pm 2) ^\circ\text{C}$. В процессе хранения контролировали бактериальный рост в заготовке, отбирая ежедневно пробы на протяжении 5 суток. Пробы высевали на МПА. При концентрации фенола 0,3% наблюдалось уменьшение количества колоний по сравнению с контролем. В то же время в отобранных образцах при концентрациях фенола 0,5% и 1,0% бактериальный рост отсутствовал. На основании полученных результатов определен минимальный интервал концентраций фенола, обеспечивающих бактериостатическое действие, который составляет 0,5-0,7%. Далее в плазму (сыворотку) крови вносили сульфат аммония и доводили его до концентрации 50% от насыщения с целью максимального осаждения иммуноглобулина G. Полученную таким образом фенольно-сульфатную суспензию хранили при температуре $(10 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Согласно полученным данным электрофореза в ПААГ практически весь IgG представлен в осадке.

Из полученных суспензий в течение 12 месяцев через определенные интервалы времени отбирали пробы и проводили исследования по нескольким показателям. Было изучено влияние предложенного способа хранения сырьевой заготовки на активность антител. Уровень активности антител определяли при помощи метода ИФА по изменению титра антител к овальбумину - у предварительно иммунизированных овальбумином норок и к клещевому энцефалиту - у человека в пуле образцов абортно-плацентарной сыворотки. Полученные данные свидетельствуют, что активность антител после 12 месяцев хранения сохраняется практически на исходном уровне вне зависимости от вида сырья и 12 месяцев хранения не влияют на биологические функции белков, в частности IgG. Так титр антител норки к овальбумину сохранялся в течение изученного срока хранения на уровне 1/6400-1/12800, а титр к клещевому энцефалиту в абортно-плацентарной сыворотке оставался в интервале 1/12800-1/25600.

Изучалась возможность микробного роста в процессе хранения сырья, пробы на посев отбирались с интервалом месяц. Результаты демонстрируют отсутствие бактериального роста в отобранных образцах в течение 12 месяцев хранения сырьевой заготовки. Следовательно, в процессе хранения создаются условия предотвращающие рост микроорганизмов и накопление бактериальных пирогенов в заготовленном сырье.

В процессе производственной заготовки плазмы (сыворотки) крови пушных зверей происходит гемолиз эритроцитов и других клеточных компонентов крови, что приводит к загрязнению сырьевой заготовки различными клеточными протеазами. Что ведет в конечном итоге к нарушению нативной структуры молекул целевых белков и к их дальнейшей фрагментации. Ферментативную активность протеаз в фенольно-сульфатной суспензии оценивали с помощью определения трипсиноподобной активности в надосадочном растворе. Полученные результаты свидетельствуют о снижении

активности протеолитических ферментов в суспензии по сравнению с контрольными показателями в образцах исходного сырья в среднем 35-40 раз. Таким образом, в предложенном варианте хранения создаются условия, способствующие снижению протеазной активности и уменьшению повреждающего действия различных протеаз на целевые белки.

Перевод фенольно-сульфатной суспензии в полуфабрикат IgG для дальнейшей работы осуществляли с помощью различных методов. Наиболее оптимальным и универсальным для дальнейших манипуляций по фракционированию является осадок белка, полученный осаждением ПЭГ. ПЭГ считается наиболее мягким и неиногенным осадителем, в связи с этим не препятствует последующему использованию нехроматографического методов фракционирования и различных вариантов хроматографической очистки IgG. Для использования в последующих экспериментах фенольно-сульфатную суспензию подвергали центрифугированию для осаждения фракции, обогащенной иммуноглобулином. С целью предотвращения расслоения раствора при применении в качестве осадителя ПЭГ, необходимо снизить концентрацию SO_4^{2-} . Для удаления примесей SO_4^{2-} были использованы различные способы: диализ, ультрафильтрация, гель-хроматография, перевод сульфат-иона в малорастворимый осадок. На основании полученных результатов в дальнейшем использовали удаление примесей SO_4^{2-} за счет формирования малорастворимого CaSO_4 в процессе экстракции осадков раствором хлорида кальция. Данный способ наиболее быстрый по времени, в тоже время позволяющий сохранить активность антител и обеспечивающий высокий процент выхода белка. При экстракции осадка в 1-2 %-ом растворе хлорида кальция центрифугированием удаляют малорастворимый сульфат кальция, а IgG-обогащенную фракцию получают переосаждением с помощью 18% ПЭГ 4000 при pH 8,0. Далее исследовались осадки для изготовления препаратов IgG, полученные предложенным выше способом из сырья различной видовой принадлежности. В результате процент выхода и процент чистоты IgG норки и человека в полуфабрикатах для получения препаратов иммуноглобулина составили следующие значения, соответственно: куны – 92-94% и 49-51%, человек – 93% и 51%. Полученные результаты демонстрируют, что проведенные стадии фракционирования позволяют получать полуфабрикаты целевого белка с высоким процентом выхода независимо от видовой принадлежности сырья. Значение процента чистоты сопоставимо с показателями фракционирования нехроматографическими способами очистки. На предложенный способ хранения и получения IgG-обогащенной фракции для изготовления биопрепаратов крови выдан патент на изобретение (№2338375 «Способ хранения плазмы или сыворотки крови для получения иммуноглобулиновых и альбуминовых биопрепаратов»). Растворы конечных осадков обладают заданными характеристиками для дальнейшего их фракционирования и получения иммуноглобулиновых биопрепаратов либо с помощью хроматографических подходов, либо с помощью нехроматографических технологий на основе этанола, риванола или каприловой кислоты.

Таким образом, предложенный способ обеспечивает длительное хранение сырьевой заготовки при плюсовых значениях температуры в условиях способствующих инактивации бактериальных и вирусных агентов, обеспечивающих сохранение биологических свойств белков, что позволяет проводить формирование обогащенной фракции IgG для проведения дальнейших стадий фракционирования с целью изготовления биопрепаратов крови.

Биохимические параметры IgG фракции, полученной с помощью риванола

Были проведены исследования на предмет перспективности использования риванола для получения иммуноглобулинового препарата норки. С этой точки зрения изучали возможность очистки IgG путем его экстракции раствором риванола из осадка γ -глобулинов, полученных фракционированием плазмы под действием ПЭГ (изложенным выше способом). Суспендирование осадков осуществляли в пределах значений pH от 4,0 до 10,0 при концентрации риванола от 0,4 до 2,0%. Концентрацию IgG определяли прямым конкурентным методом ИФА для расчета процента чистоты и процента выхода целевого белка.

Установлено, что при pH 4,0 и концентрациях риванола 0,6-2,0% γ -глобулиновый осадок практически полностью (96%) растворялся. С увеличением pH растворимость белков существенно снижалась, а при pH 9,0-10,0 в надосадочный раствор риванола переходит до 37% от общего белка.

При концентрации риванола 0,6% и pH экстрагирующей среды 5-9 отмечались (зарегистрированы) наименьшие концентрации общего белка в надосадочных фракциях. С увеличением концентрации риванола до 0,8-1,5% при pH 6,0-8,0 в надосадочном растворе концентрации общего белка увеличились в среднем в 1,5-1,9 раза. Наименьший уровень экстракции наблюдался при pH 10,0 в надосадочной фракции содержалось 4-18% от общего белка.

В образцах надосадочных фракций прямым конкурентным методом определяли концентрацию IgG для оценки биохимических параметров фракции. В качестве контроля использовали эквивалентное количество сырого осадка, экстрагированного в 5 объемах (вес/объем) 0,85% раствора натрия хлорида. Установлено (табл. 3 и 4), что при pH 4,0 и в присутствии риванола 0,6-2,0% процент чистоты целевого белка колеблется в пределах 43-51% и не отличается от величины такового показателя в контроле. В таких условиях зарегистрирован наивысший показатель экстрагируемости IgG (96%), который из-за погрешности используемого метода может на 4% превышать максимально возможное его содержание в исходном осадке. Аналогичная закономерность – отсутствие влияния риванола на процент выхода и процент чистоты IgG – наблюдалось при pH инкубационной среды 5,0. Экстракция IgG при pH 6,0 приводила к увеличению процента чистоты (60-85%) целевого белка и снижала его выход до 60-83%. Наиболее существенный фактор очистки достигался при pH 7,0-10,0. В частности, наименьшая величина процента

чистоты при нейтральных и щелочных значениях pH была не ниже 72%. Наиболее очищенные образцы IgG (90-101%) формировались в условиях pH 9,0-10,0. Однако выход целевого белка при этом существенно снижался. Так при концентрации риванола 0,6% и pH в пределах значений 6,0-10,0 выход IgG по убывающей составил 64-30%. При тех же значениях pH и в присутствии 0,8% риванола обсуждаемый показатель снижался от 85% до 35%. В условиях нейтрально-щелочной экстракции (pH 7,0-9,0), при концентрации риванола 1,0-2,0% до 50% IgG присутствовало в надосадочной фракции. Наименьший выход IgG в его максимально очищенной форме характерен для pH 10,0.

Надосадочные фракции и осадки, полученные под действием риванола, анализировали в градиентном (3-25%) ПАГ электрофорезе. Установлено, что максимально очищенные образцы (степень чистоты IgG 100 и более процентов), полученные при pH 9,0 или 10,0, имели в своем составе примеси трансферрина и гемоглобина, а при высоких концентрациях риванола (1,5-2,0%) зарегистрировано усиление полосы гемоглобина и появление на электрофореграммах высокомолекулярных примесных белков или олигомеров IgG. В риванольных надосадках присутствовали также другие индивидуально различные 3-4 белка в качестве следовых количеств примесей. При pH от 4,0 до 6,0 белковые спектры IgG обогащенных фракций принципиально не отличались от бросовых осадков. В риванольных растворах IgG только при pH 7,0 альбумин присутствовал в следовых количествах и далее при pH 8,0-10,0 в IgG обогащенных фракциях альбумин зарегистрировать не удалось. Аналогичный электрофоретический анализ проводили с образцами бросовых осадков, сформированных в процессе риванольного фракционирования. Установлено, что при всех использованных концентрациях риванола и pH 8,0-10,0 альбумин практически полностью переходил в осадок, а трансферрин более или менее равномерно распределялся между целевой надосадочной фракцией и осадком. Необходимо также отметить особенности белкового спектра осадков, формирующихся при кислых значениях pH. Известно, что при pH 4,0-4,5 риванол не взаимодействует с белками, т.е. не обладает агрегирующе-осаждающим действием. Тем не менее, по нашим данным около 4% от общего белка в обсуждаемых условиях переходило в осадок, в котором содержался преимущественно IgG и в меньшей степени альбумин.

Таблица 3

Процент чистоты IgG норки в надосадке в зависимости от значения pH раствора и концентрации риванола, полученных экстракцией γ -глобулинового осадка

pH	Концентрация риванола, %					
	0,6	0,8	1,0	1,2	1,5	2,0
4	43,2 \pm 1,2	45,4 \pm 1,4	40,6 \pm 1,2	42,8 \pm 1,1	51,6 \pm 1,5	50,5 \pm 0,9
5	54,3 \pm 0,9	42,2 \pm 1,5	46,1 \pm 1,3	51,6 \pm 1,9	53,3 \pm 1,4	55,9 \pm 1,8
6	74,8 \pm 0,8	68,4 \pm 1,6	68,2 \pm 1,6	72,5 \pm 1,5	80,3 \pm 1,7	85,1 \pm 1,8
7	85,3 \pm 1,4	86,1 \pm 1,3	93,4 \pm 1,7	89,1 \pm 1,4	84,7 \pm 1,8	72,6 \pm 1,2

8	94,3±1,3	95,1±1,6	93,5±1,3	96,6±1,5	90,3±1,8	89,8±1,4
9	92,6±1,6	95,8±1,3	99,3±1,2	96,1±1,7	104,1±1,5	100,8±1,7
10	90,6±1,4	96,5±1,5	94,2±1,6	100,2±1,7	98,7±1,3	90,7±1,3

Примечание: X-ср. арифметическая, м-ошибка средней, n=5

Таблица 4.

Процент выхода IgG норки в в надосадке в зависимости от значения рН раствора и концентрации риванола, полученных экстракцией γ -глобулинового осадка

рН	Концентрация риванола, %					
	0,6	0,8	1,0	1,2	1,5	2,0
4	98,1±1,3	104,3±1,9	101,5±1,6	96,6±1,5	102,1±1,4	101,3±1,3
5	96,5±1,4	101,8±1,6	98,2±1,7	99,3±1,7	95,8±1,5	95,3±1,5
6	64,8±0,8	85,3±1,6	72,1±1,5	74,9±1,8	66,3±1,5	60,2±1,3
7	55,6±1,3	79,7±1,4	70,3±1,1	48,9±1,4	50,1±1,6	55,3±1,7
8	48,2±1,1	82,3±1,4	64,9±1,5	56,1±1,5	50,8±1,7	61,9±1,5
9	33,3±1,3	51,2±1,2	49,6±1,7	54,8±1,5	47,4±1,4	50,5±1,6
10	30,5±0,9	35,4±0,9	41,2±1,2	30,8±1,4	16,8±0,7	25,2±1,1

Примечание: Контроль 100±7%, X-ср. арифметическая, м-ошибка средней, n=5

Таким образом оптимальными условиями экстракции IgG из обогащенных ПЭГ-овских осадков являются: значение концентрации риванола от 0,6 до 0,8 % и интервал рН от 7,0 до 8,0.

Биохимические параметры IgG фракции, полученной с помощью каприловой кислоты

Каприловая кислота используется в производстве препаратов плазмы как осаждающий и как вирус-инактивирующий реагент. В то же время ее соли при нейтральных рН используются как стабилизаторы белка (в частности альбумина) (Steinbuch, 1980; Русанов и др., 1983). Исследовали влияние концентрации каприловой кислоты и рН в процессе экстрагирования IgG из состава γ -глобулиновой фракции, полученной с помощью ПЭГ (способ изложен выше). Установлено, что при рН 3,0 или 4,0 до 47% общего белка находилось в форме осадка. Наибольший осаждающий эффект зарегистрирован при рН 4,0 и концентрации каприловой кислоты 1,0%. Концентрации каприловой кислоты 0,3% и 0,5%, а также рН инкубационно-экстрагирующей среды 3,0 и 4,0 приводили к осаждению 23-40% от общего белка. При рН 5,0 и 6,0 в присутствии концентраций каприловой кислоты от 0,3% до 1% в осадке оставалось не более 13% от общего количества белка (табл. 6).

Таблица 6.

Процент выхода общего белка в надосадке в зависимости от условий экстракции осадка с помощью каприловой кислоты

рН инкубационной среды	Концентрация каприловой кислоты (в %)		
	0,3	0,5	1,0
3	77,5±1,2	60,6±1,1	75,2±1,2
4	70,4±1,1	74,5±1,1	53,1±0,7
5	88,2±1,3	98,1±1,1	70,6±1,1
6	87,1±1,3	99,3±0,9	96,7±0,8

Примечание: X-ср. арифметическая, м-ошибка средней, n=5

Степень очистки IgG (табл. 7) в зависимости от величины рН варьировала от 45% до 85%. Установлено, что в условиях инкубирования при рН 3,0 и концентрации каприловой кислоты 0,3%-1% процент чистоты составил 70-80%. Показано также, что эта тенденция сохраняется при рН 4,0. При рН 5,0 и 6,0 степень очистки IgG не отличалась от контрольных показателей, свойственных исходному раствору осадка, предназначенного к фракционированию. Процент выхода IgG при рН 3,0 и 4,0 находился в пределах 70-85%, а при рН 5,0 и выше – достигал 99%.

Таблица 7.

Процент выхода и процента чистоты IgG норки в надосадке в зависимости от условий экстракции осадка с помощью каприловой кислоты

рН	Показатели качества IgG- обогащенной фракции	Концентрация каприловой кислоты, %		
		0,3	0,5	1,0
3	% чистоты	70,6± 0,7	75,6± 1,1	80,7± 1,1
	% выхода	80,4± 1,5	80,2± 1,6	70,9± 1,2
4	% чистоты	75,1± 1,6	80,4 ± 1,4	85,6± 1,4
	% выхода	85,2± 1,5	75,7 ± 1,3	80,5±1,2
5	% чистоты	50,2±1,2	56,7±1,3	45,8±1,1
	% выхода	95,3±1,6	97,1±0,8	99,1±0,7

Примечание: X-ср. арифметическая, м-ошибка средней, n=5

Электрофоретический анализ образцов надосадочных фракций и осадков, полученных в процессе фракционирования, свидетельствует, что даже при использовании неагрегирующих (не осаждающих) концентраций каприловой кислоты (0,3-0,5%) в составе нерастворившихся белков всегда присутствовал IgG. Наименьшее содержание альбуминов в IgG обогащенной фракции характерно для экстракции при рН 3,0 и 4,0. В условиях более высоких значений рН белковый спектр надосадка не отличим от такового в контроле.

На основании полученных данных оптимальными условиями экстракции IgG из осадка при помощи каприловой кислоты являются 0,5-1% концентрация кислоты и интервал рН от 4,0 до 5,0.

Биологические свойства субстанции иммуноглобулинового биопрепарата

Проблема производства инфекционно безопасных биопрепаратов крови, с точки зрения предотвращения передачи вирусных инфекций, до сегодняшнего дня остается актуальной (Панов, 2004). Ее сущность заключается в невозможности обеспечить безопасность сырья, используемого для производства препаратов крови, только проведением скрининговых тестов. Помимо этого необходимо использовать специальные технологические стадии в производстве, обеспечивающие инактивацию и(или) удаление вирусных частиц в процессе фракционирования плазмы (сыворотки) крови (WHO Technical Report Series, №924, 2004). С точки зрения вирусной природы заболевания, типа вируса алеутской болезни норок и его широкой распространенности среди звероводческих хозяйств была изучена возможность получения инфекционно безопасных биопрепаратов крови. Плазму (сыворотку) крови заготавливали от норок имеющих соответствующие клинические симптомы заболевания алеутской болезнью и дающих положительную реакцию в РИЭОФ (реакция иммуноэлектроосмофореза). Изготовление иммуноглобулиновых биопрепаратов осуществляли с помощью технологии, включающей изложенные в предыдущих разделах способ заготовки и хранения сырьевой закладки, а также с использованием стадий фракционирования риванолом и каприловой кислотой. С целью безопасности и профилактики распространения гемотрансфузионным путем алеутской болезни норок при применении биопрепарата, с разрешения национального контролирующего органа, был проведен необходимый комплекс профилактических противоэпизоотических мероприятий. С учетом инкубационного периода алеутской болезни норок от 30 дней до 2-х лет (Сюрин и др., 1998), наблюдение за животными продолжалось в течение 4-х месяцев после введения иммуноглобулинового биопрепарата, с периодическим исследованием образцов сыворотки крови на наличие антител к вирусу алеутской болезни норок. На протяжении всего периода исследования у животных не было выявлено положительных реакций в РИЭОФ. В течение всего срока наблюдения у животных также не было выявлено клинических признаков заболевания алеутской болезнью норок. С учетом фармакокинетики всасывания препарата и периода полувыведения иммуноглобулина G из кровяного русла (который составляет в среднем 21 день) исследовали наличие положительной реакции в РИЭОФ образцов сыворотки крови норок на 3, 10, 15, 20 и 30 день после введения иммуноглобулинового биопрепарата. Несмотря на положительную реакцию на наличие антител против вируса алеутской болезни норок в образцах 3-х серий препарата, противовирусные антитела во всех образцах сыворотки крови норок не были обнаружены. С помощью ДИД изучили наличие иммунного ответа на введение иммуноглобулинового биопрепарата представителям семейства куньих (хорек, соболь). Исследовали образцы сывороток хорьков и соболя против иммуноглобулина G норки на 3, 10, 15, 20 и 30 день после введения. Наличия преципитационных полос не обнаружено.

На основании полученных результатов после применения иммуноглобулинового биопрепарата, можно сделать заключение, что технология изготовления иммуноглобулинового биопрепарата позволяет получать серии препарата из инфекционно опасного сырья, положительного в РИЭОФ, не обладающие способностью переноса вируса алеутской болезни норки. Введение иммуноглобулинового биопрепарата представителям семейства куньих (хорек, соболь) не вызывает индукцию синтеза антител на введение иммуноглобулина норки.

ВЫВОДЫ

1. Разработана универсальная схема получения IgG различных видов животных и человека, основанная на осаждении с помощью ПЭГ 4000 с дальнейшими 2 циклами анионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе и заключительной гель-хроматографией на сефадексе G-200. Конечные образцы IgG различных видов животных и человека гомогенны в градиентном 5-25% электрофорезе ПААГ и представлены мономерной формой на 99%.
2. На основе выделенных IgG норки сконструированы два лабораторных варианта ИФА на базе прямого и прямого конкурентного метода для определения IgG норки. Чувствительность прямого метода 9,8 нг/мл, прямого конкурентного 39,1 нг/мл. Линейный участок градуировочной зависимости находится в интервале у прямого метода 9,8 – 1250 нг/мл, у прямого конкурентного 39,1-625 нг/мл.
3. С помощью полученных видовых IgG изучено иммунологическое сходство IgG норки с IgG различных видов животных и человека. Установлено, что наибольшим сродством обладают образцы IgG представителей семейства куньих (соболь и хорек). Численные значения, полученные с помощью наиболее специфичного метода (прямой конкурентный ИФА), составили для соболя - 44%, для хорька - 32%. IgG представителей других видов животных и человека имели незначительный перекрест с IgG норки.
4. Разработан способ хранения и получения IgG-обогащенных фракций из плазмы (сыворотки) крови включающий 1% обработку фенолом и сульфатом аммония 50% концентрацией от насыщения. Предложенный способ обеспечивает длительное хранение сырьевой заготовки при плюсовых значениях температуры в условиях способствующих инактивации бактериальных и вирусных агентов, при сохранении биологических свойств белков.
5. Изучены закономерности фракционирования IgG-обогащенных фракций при помощи риванола и каприловой кислоты. Определены наиболее оптимальные физико-химические параметры процесса экстрагирования IgG, с учетом чистоты и процента выхода конечного продукта.
6. Экспериментальная технология получения иммуноглобулинового биопрепарата, включающая стадии, способствующие инактивации и элиминации вирусных частиц (постадийная схема

фракционирования/обработки фенолом, риванолом, каприловой кислотой, этанолом) позволяет получать из инфекционно опасной сырьевой заготовки конечный продукт, не обладающий способностью переноса вируса алеутской болезни норок.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Барсуков А.К. К вопросу о совершенствовании технологии производства фармацевтических биопрепаратов / А.К. Барсуков, А.В. Бармин, О.Ю. Нестерова, Е.Н. Желтышев, **А.И. Кузнецов**, О.В. Кожевникова, В.А. Грачева, Ф.М. Касимов, А.Н. Панин, В.И. Смоленский, В.И. Уласов// Сельскохозяйственная биология. – 2005. - № 6. – С. 84-91.
2. Барсуков А.К. Стандартизация биопрепаратов крови / А.К. Барсуков, А.В. Бармин, Ф.М. Касимов, **А.И. Кузнецов**, О.Ю. Нестерова, Г.Н. Бурдов, А.Н. Панин, В.И. Смоленский, В.И. Уласов, В.Л. Свидерский, А.Е. Хованских// Ветеринария. – 2005. - № 7. – С. 43-48.
3. Барсуков А.К. Иммунобиопрепараты: показатели качества и перспективы развития / А.К. Барсуков, А.В. Бармин, **А.И. Кузнецов**, О.Ю. Нестерова, Ф.М. Касимов, О.В. Кожевникова, А.Н. Панин, В.И. Уласов, В.И. Смоленский, Е.Ф. Панарин, М.В. Соловский, О.В. Назарова, И.В. Москвичева, Свидерский, А.Е. Хованских, В.Х. Хавинсон, Г.А. Рыжак, В.А. Ситников, С.И. Стяжкина, В.А. Грачева// II Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2005». Сборник материалов. – Москва. 2005. – С. 332-333.
4. Barsukov A.K. Informational priority of international development of socially usefull biotechnology / A.K. Barsukov, Zhuravlev V.A., Savinsky S.S., Barmin A.V., **Kuznetsov A.I.**, Nesterova O.Yu., Kozhevnikova O.V., Ushnurtseva S.A., Zheltyshev E.N.// International Conference on Engineering Education. - Gliwice, Poland. 2005. – Conference Proceedings. – P. 76-81.
5. **Кузнецов А.И.** Фармацевтическая биотехнология: фундаментальные, прикладные исследования и научно-технические разработки / А.И. Кузнецов, А.К. Барсуков, А.Н. Бохан, Ф.М. Касимов, О.Ю. Нестерова, О.В. Кожевникова, Е.Н. Желтышев, В.А. Храмов, Д.И. Шелехов, А.Н. Панин, В.И. Уласов, В.И. Смоленский, Е. Ф. Панарин, М. В. Соловский, О. В. Назарова, А.Е. Хованских, В. Х. Хавинсон, Г. А. Рыжак // II Всероссийский форум «Здоровье нации – основа процветания России». Сборник материалов .- Москва.- 2006.- С. 86-87.
6. Барсуков А.К. Совершенствование технологии производства биопрепаратов крови / А.К. Барсуков, О.Ю. Нестерова, **А.И. Кузнецов**, Ф.М. Касимов, В.А. Журавлев, Е.Н. Желтышев, В.А. Храмов // XIX Международная научно-техническая конференция «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии». Сборник материалов. – Уфа. 2006. – С. 54-55.
7. Барсуков А.К. Необходимые составляющие целесообразного развития нормативно-технической базы за контролем качества фармацевтических биопрепаратов / А.К. Барсуков, О.Ю. Нестерова, **А.И. Кузнецов**, О.В. Кожевникова, Е.Н. Желтышев, В.А. Храмов // Третья международная научно-практическая конференция «Исследование, разработка и применение высоких

технологий в промышленности». Сборник трудов. - Санкт-Петербург. 2007. - С. 160-162.

8. Барсуков А.К. Биохимические основы технологии производства биопрепаратов из некондиционной (утильной) плазмы (сыворотки) крови / А.К. Барсуков, О.Ю. Нестерова, **А.И. Кузнецов** // Четвертая международная научно-практическая конференция «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности». Сборник трудов. - Санкт-Петербург. 2007. – С. 250-251.

9. Барсуков А. К. Выделение белков-стандартов иммуноглобулина G и альбумина, изучение их олигомеризации и антигенных свойств в процессе хранения в насыщенном растворе сульфата аммония. / А.К. Барсуков, А. В. Бармин, **А. И. Кузнецов**, О. Ю. Нестерова, С. А. Ушнурцева, А. Н. Панин, В. И. Смоленский, В. И. Уласов, В. Л. Свидерский, А. Е. Хованских. //Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. - т. 45. - №3. - С. 378-383.

10. Барсуков А. К. Разработка экспериментальных подходов на основе белков-стандартов для оценки качества биопрепаратов крови и иммунопероксидазных конъюгатов, специфичных к иммуноглобулинам G человека и животных. / А.К. Барсуков, А. В. Бармин, **А. И. Кузнецов**, О. Ю. Нестерова, С. А. Ушнурцева, А. Н. Панин, В. И. Смоленский, В. И. Уласов, В. Л. Свидерский, А. Е. Хованских. // Прикладная биохимия и микробиология. - 2009.- т. 45. - №4. - С. 487-492.

Просьба отзывы отправлять по факсу:

(843) 238-76-01

Отдел аспирантуры Казанского государственного университета

или на email: zina.abramova@mail.ru